

NBR J04158796

-1- (WPAT)

Title - Prepn. of high purity solns. of sodium hyaluronate - by ultrafiltration
of fermentation broths of hyaluronic acid and treatment with charcoal

Patent Assigned to: - (CHCC) CHISSO CORP

Inventor - FUJII M, KUROKAWA Y, MIENO K, MIZOKAMI K, SATOH I

Priority- 90.10.23 90JP-283394

NUM - 6 patent(s) 3 country(s)

Patent Number -- DE4134854 A 92.04.30 * (9219)

- GB2249315 A 92.05.06 (9219) 14p
- JP04158796 A 92.06.01 (9228) 6p C12P-019/26
- DE4134854 C2 93.03.04 (9309) 4p C12P-019/04
- GB2249315 B 93.05.26 (9321) C08B-037/08
- JP94030605 B2 94.04.27 (9415) 4p C12P-019/26

Based on JP4158796

AP -- 91DE-4134854 91.10.22

- 91GB-022504 91.10.23
- 90JP-283394 90.10.23
- 91DE-4134854 91.10.22
- 91GB-022504 91.10.23
- 90JP-283394 90.10.23

IC1 - C08B-037/08 C12P-019/04 C12P-019/26

Abstract - DE4134854 A

Prepn. of a high purity aq. soln. of sodium hyaluronate (I) comprises (a)
treatment of a fermentation broth of hyaluronic acid (II) with activated
charcoal followed by ultrafiltration, or (b) ultrafiltration of the
broth, treatment with charcoal and ultrafiltration.

USE - Solns. of (I) have high viscosity, elasticity and water
retention properties and are widely used in the cosmetics industry and in
pharmaceuticals for treatment of eye damage, wounds and arthropathia. For
these purposes, solns. of (I) must have high mol. wt. (I) and be of high
purity

⑫ 公開特許公報 (A) 平4-158796

⑬ Int.CI.

C 12 P 19/26
C 08 B 37/08

識別記号

Z

府内整理番号

8214-4B
7624-4C

⑭ 公開 平成4年(1992)6月1日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全6頁)

⑮ 発明の名称 ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の製造法

⑯ 特願 平2-283394

⑰ 出願 平2(1990)10月23日

⑱ 発明者 佐藤 郁夫 熊本県水俣市築地5番118号

⑲ 発明者 三重野 和典 鹿児島県出水市米ノ津町26番18号

⑳ 発明者 潤上 香子 熊本県水俣市築地8番113号

㉑ 発明者 黒川 泰弘 熊本県水俣市陣内2丁目7番6号

㉒ 発明者 藤井 正弘 東京都大田区大森西4丁目9番8-501号

㉓ 出願人 チツソ株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

㉔ 代理人 弁理士 舟橋 篤子

明細書

1. 発明の名称

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液から、純度の高いヒアルロン酸ナトリウム水溶液を製造する工程において、活性炭処理ついで限外濾過処理、もしくは限外濾過、活性炭処理ついで限外濾過処理の工程を実施することを特徴とする、純度の高いヒアルロン酸ナトリウム水溶液の製造法。

(2) 活性炭処理を塩化ナトリウム濃度0.2M以上の条件で行う請求項1記載の製造法。

(3) 限外濾過処理を分子量10万以下の限外濾過膜を用い、処理液の電気伝導度が0.4S/cm以下になるまで透析を行った後に濃縮する請求項1記載の製造法。

(4) ヒアルロン酸ナトリウムの純度がヒアルロン酸ナトリウム水溶液を凍結乾燥した時の凍結乾燥物に対し、ヒアルロン酸ナトリウム85重量

%以上、ヒアルロン酸ナトリウム量に対し漏発残留物が100重量%以上130重量%以内、かつ蛋白質が0.1重量%以下である請求項1記載の製造法。

(5) ヒアルロン酸ナトリウム水溶液がヒアルロン酸ナトリウムの1重量/容量(g/g)水溶液である請求項1記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液から、高純度のヒアルロン酸ナトリウムの水溶液を直接製造する方法に関するものである。

(従来の技術)

ヒアルロン酸は、関節、硝子体、網膜、軟骨、皮膚、鳥類のとさか等の結合組織中にその構成成分として存在し、組織の柔軟性、構造維持、細胞の代謝調節等に重要な機能を果たしている。またヒアルロン酸ナトリウムは、高分子物質であり、その溶液は強い粘弾性を持ち、保水作用を有するところから、化粧品原料として広く使用されるほ

か、医療用、目薬、潤滑油添加剂としての用途がある。

かかる用途に用いられるヒアルロン酸ナトリウムは高分子量でかつ高純度のものであることが要求される。

ヒアルロン酸ナトリウムは工業的にはにわとりのとさかからの抽出法か、或いはヒアルロン酸を生産する能力を持つ微生物を培地に培養して製造する方法（発酵法）が行われている。

従来、高純度のヒアルロン酸ナトリウムの水溶液は、抽出法又は発酵法により得られたヒアルロン酸ナトリウム含有液を4種アンモニウム塩による沈澱形成、再溶解、プロテアーゼ処理、活性炭処理、アルコール添加によるヒアルロン酸ナトリウム析出（晶析）、分離、乾燥等の工程を経て、一旦ヒアルロン酸ナトリウム粉末を作り、それを再溶解する方法により製造されていた。

（発明が解決しようとする課題）

これらの方法では、培養液を精製した後に、エタノール等の沈澱剤を添加してヒアルロン酸ナト

リウムを一旦沈澱させて粉末状ヒアルロン酸ナトリウムを製造し、これを再溶解して高純度のヒアルロン酸ナトリウムの水溶液とする面倒な工程が必要であった。

今までではヒアルロン酸の発酵培養液から純度の高いヒアルロン酸ナトリウム水溶液を直接製造することは行われていなかった。

本発明は、高純度のヒアルロン酸ナトリウム水溶液を得るために、前記のような面倒な方法を採ることなく、直接、発酵培養液から純度の高いヒアルロン酸ナトリウムの水溶液を製造する方法を提供することを目的とする。

（課題を解決するための手段）

すなわち、ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液を活性炭処理し、処理液を通過後、限外通過を行うことにより、化粧品原料として使用できる高純度のヒアルロン酸ナトリウム水溶液を製造することを特徴とする。

本発明にいう「純度が高い」とは、次のことを意味している。ヒアルロン酸ナトリウム水溶液を

凍結乾燥した時の凍結乾燥物に対し、ヒアルロン酸ナトリウムを85重量%以上含有し、蒸発残留物はヒアルロン酸ナトリウム量に対し、100重量%以上130重量%以内、かつ蛋白質はヒアルロン酸ナトリウム量に対し0.1重量%以下の純度である。

本発明に用いるヒアルロン酸ナトリウムは、ヒアルロン酸產生能を有する微生物を栄養培地に培養した培養液から得ることが出来る。ヒアルロン酸を得る為に本発明に使用する微生物はヒアルロン酸を菌体外に分泌する菌株であればいずれも使用可能であるが、ストレプトコッカス属の菌種が良い。例えばストレプトコッカス・ビオゲネス、ストレプトコッカス・エクイ、ストレプトコッカス・エクイシミリス、ストレプトコッカス・ディスガラクティエ、ストレプトコッカス・ズーエピデミクス等があげられる。

本発明に用いる培地としては、ヒアルロン酸生産菌を培養するのに通常用いられる培地を用いればよく、例えばブドウ糖2.0～3.0%、酵母エキス0.5%、リン酸1カリウム0.3%、リン酸2カリウ

ム0.2%、チオ硫酸ナトリウム0.01%、硫酸マグネシウム7水塩0.01%、亜硫酸ナトリウム0.002%、塩化コバルト0.001%、塩化マンガン0.001%、消泡剤0.5%を含む成分でpH6.0～8.5の培養液を用いる事が出来る（但し%はいずれも重量をも、容量をもとした重量/容量%をあらわす）。培養は振盪培養、通気培養等の好気的条件下で行う。培養温度は25℃～40℃、好ましくは30℃～35℃の温度で、pHは6.5～8.0好ましくは7.0に調整して行う。培養は通常1～3日間行い、ヒアルロン酸を培地に生成蓄積させる。培養終了液は培地残存成分と発酵過程で生成した高分子成分、低分子成分、色素類と菌体及びヒアルロン酸の混合物である。

活性炭処理でヒアルロン酸以外の高分子成分や色素類及び低分子成分の一部を吸着・除去する。特に高分子成分としては、アレルギー反応の原因となる蛋白質の除去を十分に行う必要がある。菌体は活性炭処理後の活性炭を通過除去する際に一緒に除去される。

活性炭を用いて、高分子成分、特に蛋白質を吸着・除去する条件について本発明一等は試験検討を行った結果、0.2 M以上の食塩の共存下で活性炭処理を行うことにより、ほぼ完全に蛋白質を吸着・除去出来ることを見出した。活性炭処理時の食塩濃度と、得られたヒアルロン酸ナトリウム当たりの蛋白質含量との関係を次表に示す。

表1

活性炭処理時の 食塩濃度(M)	ヒアルロン酸ナトリウム当たり の蛋白質含量(重量%)
0	0.93
0.01	0.67
0.05	0.32
0.1	0.16
0.2	0.09
0.3	0.05
0.4	0.04

この結果から判るように、活性炭処理を行うときは、0.2 M以上、好ましくは0.3~0.4Mの食塩の共存下で活性炭処理を行うことが必要である。

ン(分子量3万)にて限外通過操作を行う時、電気伝導度とヒアルロン酸ナトリウム純度及び未発酵物との関係は次の表2の様な結果が得られる。該電気伝導度の値はヒアルロン酸ナトリウム濃度により変わるため、本発明にあっては、該電気伝導度の値はすべてヒアルロン酸ナトリウム濃度が0.2重量% (25°C) のときの値で示した。

表2

電気伝導度 (mS/cm)	純度 [*] (重量%)	未発酵物 ^{**} (重量%)
20.0	6.0	1.5
5.8	17.8	6.6
3.6	36.7	3.2
0.50	79.8	1.50
0.37	89.1	1.25
0.20	91.3	1.11

- * 1 混合乾燥物当たりのヒアルロン酸ナトリウム純度
- * 2 ヒアルロン酸ナトリウム1%に換算した値
この結果から、純度が高いヒアルロン酸ナトリウム溶液を製造するには、限外通過処理を電気伝

活性炭処理した滤過液は限外通過することにより、培地由来もしくは発酵過程で生成し活性炭処理で残存する低分子成分及び活性炭処理時に添加した食塩を除去することができる。

発酵培養液中のヒアルロン酸ナトリウムは通常70~80万以上の分子量を持つ。他方、発酵原料として用いたブドウ糖やリン酸塩類等或いは発酵中に生成した有機酸の塩類の分子量は通常5千以下である。

従って、分子量6千~5万の限外通過膜を用いて限外通過を行うと分子量がこの範囲以下の物質は除去することができる。ただ、1回の限外通過操作だけでは通常十分に低分子成分を除去することはできないので、精製水を間欠的或いは連続的に加えて繰り返し限外通過操作を行う必要がある。低分子成分及び食塩の除去とともに電気伝導度は低下するので、電気伝導度を測定することで精製の進み具合を判断することが出来る。例えば、ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液の活性炭処理滤過液に精製水を加え、ミリポア型ミニタ

ン(分子量3万)にて限外通過操作を行う時、電気伝導度が0.4mS/cm以下になるまで行うことが必要である。

また、本発明の製造方法は限外通過処理を、活性炭処理し該活性炭を分離除去した後に行うか、もしくは限外通過、活性炭処理、活性炭分離除去ついで限外通過処理を行うものである。この場合には1回目の限外通過処理を行う液としては発酵培養液の除菌滤過液を使用することになる。活性炭処理の前に限外通過処理を行うことで、そうしない場合に比べてより少量の活性炭で同様の精製効果を得ることが出来る。

本発明により、ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液から純度の高いヒアルロン酸ナトリウム溶液を直接製造することが出来るが、更にこれを使用目的に応じ、最終通過や過濾器による濃縮を常法により行っても良い。

(発明の効果)

本発明により、高純度のヒアルロン酸ナトリウムの水溶液を、発酵培養液から直接製造することが出来る。従来の困難な方法を簡便にすることが

でき、コストを引き下げ、しかも化粧原料や医薬として使用することが出来る高純度の製品を得ることが可能になった。

(実施例)

以下、本発明を実施例に基づいて説明するが、本発明はこれに限定されるわけではない。

実施例 1

ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液 300ml を 3 倍希釈し、食塩を添加し溶解して食塩濃度を 0.3 M に調整した。これに活性炭（武田薬品工業製、白サギ A - 50W、50重量%含水品）60g を添加、1 時間攪拌して活性炭を濾過除去した。この時の電気伝導度は 22.0 mS/cm であった。この濾過液を分画分子量 3 万の限外濾過膜（日本ミリポア製、ミニタン）で精製水を加えながら限外濾過を行い、電気伝導度が 0.24 mS/cm になるまで処理した。この処理液のヒアルロン酸ナトリウム当たりの蛋白質は 0.06 重量%、蒸発残留物はヒアルロン酸ナトリウムの 115 重量%、純度は凍結乾燥物当たり 85.5 重量% であり、蛋白質の除去が不十分であった。

度の高いヒアルロン酸ナトリウム水溶液が得られた。

比較例 1

実施例 1 と同じ発酵培養液を用い、活性炭を添加しない以外は実施例 1 と同様に行い、電気伝導度が 0.30 mS/cm になるまで限外濾過処理を行った。

得られた処理液のヒアルロン酸ナトリウム当たりの蛋白質は 2.74 重量%、蒸発残留物はヒアルロン酸ナトリウムの 125 重量%、純度は凍結乾燥物当たり 85.5 重量% であり、蛋白質の除去が不十分であった。

比較例 2

実施例 1 と同じ発酵培養液を用い、食塩を添加しない以外は実施例 1 と同様に行い、電気伝導度が 0.20 mS/cm になるまで限外濾過処理を行った。

得られた処理液のヒアルロン酸ナトリウム当たりの蛋白質は 1.12 重量%、蒸発残留物はヒアルロン酸ナトリウムの 120 重量%、純度は凍結乾燥物当たり 86.3 重量% であり、蛋白質の除去が不十分であった。

実施例 2

ヒアルロン酸ナトリウムの発酵培養液 300ml を 3 倍希釈し、食塩を添加溶解して食塩濃度を 0.4 M に調整した。この時の電気伝導度は 28.3 mS/cm であった。これを除菌濾過し、濾過液を分画分子量 6000 の限外濾過膜（旭化成製、限外濾過モジュール、SIP-1013）で精製水を加えながら限外濾過を行い、電気伝導度が 0.38 mS/cm になるまで処理した。この処理液に食塩を 0.4 M になるように添加溶解した後、活性炭（二村化学製、タイマー S、50%含水品）30g を添加、1 時間攪拌して活性炭を濾過除去した。

活性炭濾過液を上記と同じ限外濾過膜で精製水を加えながら限外濾過を行い、電気伝導度が 0.20 mS/cm になるまで処理した。

得られた 0.2 % ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の蛋白質は、ヒアルロン酸ナトリウム当たり 0.04 重量%、蒸発残留物はヒアルロン酸ナトリウムの 114 重量%、純度は凍結乾燥物当たり 92.2 重量% であった。この 0.2 % 水溶液を上記と同じ限外濾

過膜で濃縮することにより 1 % ヒアルロン酸ナトリウム水溶液が容易に作製できた。

比較例 3

実施例 2 と同じ発酵培養液を用い、2 回目の限外濾過処理を電気伝導度が 3.6 mS/cm で停止する以外は実施例 2 と同様に行なった。

得られた 0.2 % ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の蛋白質は、ヒアルロン酸ナトリウム当たり 0.09 重量%、蒸発残留物はヒアルロン酸ナトリウムの 320 重量%、純度は凍結乾燥物当たり 36.7 重量% であり、蒸発残留物が多く純度が低かった。

特許出願人 チッソ株式会社
代理人 弁理士 丹波英子

特開平4-158796(5)

手続補正書

平成3年10月11日

特許庁長官 謹

1. 事件の表示 平成2年特許願第283394号

2. 発明の名称

ヒアルロン酸ナトリウム水溶液の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

(207) チッソ株式会社

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区西新橋一丁目10番1号
正直屋ビルディング6階 電話(3504)0717番(代表)

氏名 (8371) 井理士舟 楠葉子

5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲および発明の詳細な説明の欄



「ヒアルロン酸」に訂正する。

(8) 明細書の11頁8行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

(9) 明細書の13頁2行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

6. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を別紙の通り訂正する。

(2) 明細書の2頁10行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

(3) 明細書の3頁11行目~12行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

(4) 明細書の4頁14行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

(5) 明細書の8頁5行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

(6) 明細書の8頁19行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を
「ヒアルロン酸」に訂正する。

(7) 明細書の10頁12行目の

「ヒアルロン酸ナトリウム」を

「別紙」

2. 特許請求の範囲

(1) ヒアルロン酸の発酵培養液から、純度の高いヒアルロン酸ナトリウム水溶液を製造する工程において、活性炭処理ついで紫外線過処理、もしくは紫外線過、活性炭処理ついで紫外線過処理の工程を実施することを特徴とする、純度の高いヒアルロン酸ナトリウム水溶液の製造法。

(2) 活性炭処理を塩化ナトリウム濃度0.2M以上の条件で行う請求項1記載の製造法。

(3) 紫外線過処理を分子量10万以下の紫外線過処理を用い、処理液の電気伝導度が0.4mS/cm以下になるまで透析を行った後に濃縮する請求項1記載の製造法。

(4) ヒアルロン酸ナトリウムの純度がヒアルロン酸ナトリウム水溶液を凍結乾燥した時の凍結乾燥物に対し、ヒアルロン酸ナトリウム85重量%以上、ヒアルロン酸ナトリウム量に対し未発留物が100重量%以上130重量%以内、かつ蛋白質が0.1重量%以下である請求項1記載の製

造法。

(4) ヒアルロン酸ナトリウム水溶液がヒアルロ
ン酸ナトリウムの1重量／容量(g/g)×水溶液
である請求項1記載の製造法。

To: Dunlap & Coddington

From: Peter Kramer

8-28-98 3:00pm p. 2 of 3

04158796 JP
Mr. Doug Sorroco

1005244.002 / PRK
PRK001

CA SEARCH (90-94)

1. RECOVERY OF AQUEOUS SOLUTIONS OF SODIUM >HYALURONATE< FROM FERMENTATION BROTHS CAS SECTION- 116 CAS SUBSECTION- 002 - CAS 117-03 117-046718 CA 117:046718 NDN- 010-0435-6414-8

SATOH, IKUO; MIENO, KAZUNORI; MIZOKAMI, KYOUKO; KUROKAWA, YASUHIRO; FUJII, MASAHIRO

GER. OFFEN., APR 30 1992, 5 PP. PATENT NUMBER- 4134854 PATENT APPLICATION NUMBER- 4134854 DATE FILED- OCT 22 1991 DOCUMENT TYPE- PATENT CODEN- GWXXBX LOCATION OF WORK- JAPAN PATENT CLASS- C12P0190400A; C08B0370800B; C12P0190400J; C12R0014600J; B01J0202000-; C01B0310800-; B01D0611400-; B01D0612400-; A61K0070000-; A61K0317150- PATENT ASSIGNEE(S)- >CHISSO< CORP. SUBFILE CODE- BIC PATENT APPLICATION PRIORITY- 901023JP90-283394 ORIGINAL PATENT APPLICATION COUNTRY- DE LANGUAGE- GERMAN Copyright 1998 by American Chemical Society

NO-ABSTRACT

DESCRIPTOR(S)- >HYALURONATE< RECOVERY FERMN CAS REGISTRY/EC NUMBER(S)- 7440-44-0; 7647-14-5; 9067-32-7.

U. S. Patent Bibliographic Database

2. Process for preparing >hyaluronic< acid - PAT 00-00-91 05071751
NDN- 095-0173-0268-2

INVENTOR(S)- Morita, Hiroshi; Fujii, Masahiro

PATENT NUMBER- 05071751 PATENT APPLICATION NUMBER- 336913 DATE FILED- 1989-04-12 PATENT DATE- 1991-12-10 NUMBER OF CLAIMS- 2 EXEMPLARY CLAIMS- 1 ART/GROUP UNIT- 188 PATENT CLASS- Invention (utility) patent INVENTOR COUNTRY/ZIPCODE- JPX; JPX PATENT ASSIGNEE(S)- >Chisso< Corporation ASSIGNEE CITY- Osaka ASSIGNEE COUNTRY- JPX ATTORNEY, AGENT, OR FIRM- Philpitt, Fred U.S. PATENT CLASS- 4351010000 U.S. CLASSIFICATION REFS.- X435244000; X435252100; X536055100 INTERNATIONAL PATENT CLASS- 5C12P01904; C12N00138; C12N00100; C08B03700 PATENT REFERENCE(S)- 3063914; 3929571; 3988205 PATENT REFERENCED BY- 05411874; 05563051 FOREIGN DOCUMENT REFERENCE(S)- 1063293; 1239898 FOREIGN COUNTRY CODE- JPX; JPX PATENT APPLICATION PRIORITY- 59-185150; 60-80949 PRIORITY COUNTRY CODE- JPX; JPX PRIORITY DATE- 19840904; 19850416

A process for producing a >hyaluronic< acid can be provided steadily, with a greatly improved productivity and at an inexpensive cost by incubating a >hyaluronic< acid-producing microbe in a culture medium formed by adding a blood serum or a bacteriolytic enzyme and/or a surfactant, accumulating and isolating the >hyaluronic< acid. EXEMPLARY CLAIMS- Claim- 1. A process for preparing >hyaluronic< acid comprising the steps of incubating a microbe capable of producing >hyaluronic< acid selected from the group consisting of *Streptococcus equi* FERM BP-879 and *Streptococcus zooepidemicus* FERM BP-878 in a culture medium containing newborn bovine blood serum added thereto, agitating the resultant culture medium by passing an air stream therethrough for effecting incubation while controlling the incubation temperature at 25 degrees C. to 40 degrees C. and at pH of 6.5 to 8.0, accumulating the resultant >hyaluronic< acid in said culture medium, and isolating >hyaluronic< acid therefrom.